



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 5/02, 5/06, 5/08, 5/10, 5/20, 5/24, C12P 21/00, 21/02, 21/08 // C12N 15/00, (C12N 21/00, C12R 1:91) (C12N 21/02, C12R 1:91) (C12N 21/08, C12R 1:91)		A1	(11) 国際公開番号 WO98/06822
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02749			(11) 国際公開番号 WO98/06822
(22) 国際出願日 1997年8月6日(06.08.97)			(43) 国際公開日 1998年2月19日(19.02.98)
(30) 優先権データ 特願平8/210004 1996年8月8日(08.08.96)	JP	(74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号(湯木ビル) Osaka, (JP)	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ミドリ十字 (THE GREEN CROSS CORPORATION)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区今橋一丁目3番3号 Osaka, (JP)		(74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号(湯木ビル) Osaka, (JP)	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 天辻 康夫(AMATSUJI, Yasuo)[JP/JP] 玉嶋 博(TAMASHIMA, Hiroshi)[JP/JP] 小林 薫(KOBAYASHI, Kaoru)[JP/JP] 〒573 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 株式会社 ミドリ十字 中央研究所内 Osaka, (JP)	JP	(74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号(湯木ビル) Osaka, (JP)	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
大村 孝男(OHMURA, Takao)[JP/JP] 〒536 大阪府大阪市城東区中央1丁目1番47号 株式会社 ミドリ十字 城東分室内 Osaka, (JP)		(74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号(湯木ビル) Osaka, (JP)	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(54) Title: CULTURE MEDIUM AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称 培養用培地及びその用途

(57) Abstract

A culture medium containing human serum albumin obtained by genetic manipulations (rHSA); a method for culturing animal cells characterized by culturing the cells in the above-mentioned medium; and a process for producing a physiologically active substance characterized by culturing animal cells capable of producing the physiologically active substance in the above-mentioned medium and taking up the produced physiologically active substance from the culture. The use of rHSA with uniform qualities makes it possible to achieve the proliferation of the cells and the productivity of the physiologically active substance each comparable to those achieved by using a serum-containing medium and/or a conventional serum-free medium containing HSA originating in plasma while stabilizing the medium qualities and ensuring the reproducibility of the culture.

(57) 要約

本発明は、遺伝子操作により得られたヒト血清アルブミン (rHSA) を含有してなる培養用培地、該培養用培地にて培養することを特徴とする動物細胞の培養方法、及び該培養用培地にて生理活性物質を產生可能な動物細胞を培養して当該生理活性物質を產生させ、培養物から該生理活性物質を採取することを特徴とする生理活性物質の製造方法に関する。品質の一定な rHSA を使用することにより、血清含有培地及び/または血漿由来 HSA を含有してなる従来の無血清培地を使用した場合と同等の細胞増殖性及び生理活性物質產生性を維持し、且つ培地の品質の安定化、培養の再現性の確保が可能となった。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロ伐キア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英國	LU	ルクセンブルグ	SIL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	カンピア	MD	モルドバ共和国	TD	チャード
BF	ブルガリア・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア田ユーロス	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	LA	ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴィエトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SD	スードン		

明細書

培養用培地及びその用途

技術分野

本発明は、遺伝子操作により得られたヒト血清アルブミン（以下、r H S Aともいう）を含有してなる培養用培地、及びその培地を用いて動物細胞を培養する方法あるいは生理活性物質を產生、採取する方法に関する。

背景技術

近年、D N Aの組み換え技術の進歩により、タンパク質等の生理活性物質を細胞産生物として製造する方法が研究されている。この細胞産生物の製造のためにには動物細胞の培養がより重要になってくるが、このような細胞培養を工業的規模で行うには、多量の培地が必要になる。

従来、動物細胞を生育（増殖）させる際の培地としては、極めて多種の培地、例えば、ダルベッコの改变イーグル培地（D M E M）〔Morton, H. J. J. (1970) *In vitro* 6, 89〕、F 1 2 培地〔Ham, R. O. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53, 288〕及びR P M I 1 6 4 0 培地〔Goding, J. W. (1980) *J. Immunol. Methods* 39, 285, *JAMA* 199 (1957) 519〕等が使用されてきた。しかし、これらの培地を使用して動物細胞を生育（増殖）させるには、培地に血清を加えなければならない。このため、一般には、ウシ胎児、ウマまたはヒト等の血清を1～15%程度の濃度で使用しなければならなかった。

しかし、血清含有培地を使用する際には以下の様な問題があった。

- ① 血清自体が高価なためコスト高となる。
- ② 血清にはロット差があり、再現性が要求される培養には不利である。
- ③ 細胞産生物の培養上清からの精製が困難となる。
- ④ ウィルスやマイコプラズマの汚染源となる恐れがある。

このような現状に鑑みて、培地中の血清濃度を減少させる方法が検討されている。しかし、血清濃度の減少によって細胞はその増殖性を著しく低下させるか死滅し、所望の細胞産生物（例えばタンパク質等の生理活性物質）の収量が著しく

減少するなどの問題があり、培地中の血清濃度の減少は困難であった。

このような理由から、血清を含まず、尚且つ細胞が増殖性を失わずに培養される無血清培地に対して多大な関心が持たれるようになった。

ところで、従来の無血清培地においては、細胞の増殖性を維持するための添加物として、血漿由来ヒト血清アルブミン（以下HSAともいう）が使用されている。しかしながら、血漿由来HSAは必ずしも品質が一定とは言えない。例えば、夾雜する血漿由来成分、例えばリポタンパク質、 α 1-アンチトリプシン等のタンパク質分解酵素阻害物質、トランスフェリン、セルロプラスミン、ハプトグロビンなどの金属やヘムの担体タンパク質等、脂肪酸、カルシウムイオン、トリプトファン、システイン、グルタチオン、微量の金属成分等の混入度合がその製品ロット毎に異なる。従って、これらの成分が動物細胞等の培養に与える影響が懸念される。

発明の開示

本発明は上記問題に鑑みてなされたものであり、細胞の十分な増殖性が得られると共に、品質の安定した、培養に与える影響のより小さい培養用培地を提供することを目的とする。

本発明の別の目的は安定した（再現性が良い）動物細胞の培養方法を提供することである。

さらに本発明の別の目的は、生理活性物質を産生可能な動物細胞より該生理活性物質を大量に産生、採取する方法を提供することである。

本発明者らは、上記のような事情を考慮にいれて検討を行った結果、遺伝子操作により得られたHSA（rHSA）を基本培地の添加物として用いることにより、培養時の効果を血漿由来のHSAを用いた場合と変えることなく、細胞の十分な増殖性を維持することができることを見出し本発明を完成した。即ち、本発明の培地においては品質が一定したrHSAを用いていることから、培養効果における影響をより少なく抑える（即ち、再現性を確保する）ことができる。

本発明は以下の通りである。

(1) 遺伝子操作により得られたヒト血清アルブミンを含有してなる培養用培地。

(2) 基本培地としてD M E M 培地、F 1 2 培地またはR P M I 1 6 4 0 培地を含有する上記(1)の培養用培地。

(3) 遺伝子操作により得られたヒト血清アルブミンが、ヒト血清アルブミン產生性の酵母により產生されたものである上記(1)の培養用培地。

(4) さらにインスリンを含有する上記(1)の培養用培地。

(5) さらにペプトンを含有する上記(1)の培養用培地。

(6) さらにトランスフェリンを含有する上記(1)の培養用培地。

(7) さらにインスリン、ペプトンおよびトランスフェリンを含有する上記(1)の培養用培地。

(8) 動物細胞を上記(1)の培地にて培養することを特徴とする動物細胞の培養方法。

(9) 動物細胞はそれ自体が生理活性物質を產生可能なものの、または遺伝子工学により形質転換されて異種の生理活性物質を產生するものである上記(8)の培養方法。

(10) 動物細胞がヒト腎細胞株、ハイブリドーマ、白血球、ナマルバ細胞、B A L L - 1 細胞、纖維芽細胞、リンパ球、ヒト腎細胞、メラノーマ細胞、V e r o 細胞、H e l a 細胞、C H O 細胞、W I 3 8 細胞、B H K 細胞、C O S - 7 細胞、M D C K 細胞、C 1 2 7 細胞、H K G 細胞、マウスミエローマ細胞、ヒトリンパ芽球細胞またはヒトヒトハイブリドーマ作製用親細胞、あるいはこれらのd h f r 欠損株、H G P R T 欠損株、ウアバイン耐性株である上記(8)の培養方法。

(11) 生理活性物質を產生可能な動物細胞を上記(1)の培地で培養して当該生理活性物質を產生させ、培養物から該生理活性物質を採取することを特徴とする生理活性物質の製造方法。

(12) 動物細胞はそれ自体が生理活性物質を產生可能なものの、または遺伝子工

学により形質転換されて異種の生理活性物質を產生するものである上記（11）の製造方法。

（13）生理活性物質がプロウロキナーゼ、ウロキナーゼ、アンチトロンビンIII、組織プラスミノーゲンアクチベータ、B型肝炎ウィルス表面抗原、プレS-B型肝炎ウィルス表面抗原、インターフェロン、コロニー形成刺激因子またはモノクローナル抗体である上記（11）の製造方法。

本発明の培養用培地は遺伝子操作により得られたヒト血清アルブミン（r HSA）を含有するものであれば特に限定はされない。具体的には、例えば基本培地にr HSAを添加したものが挙げられる。

本発明において、基本培地としては一般的に用いられる基礎培地が挙げられ、即ち通常動物細胞が同化しうる炭素源、消化しうる窒素源及び無機塩等を含有させたものが用いられ、また、必要に応じて微量栄養促進物質、前駆物質等の微量有効物質を配合してもよい。かかる基礎培地としては、細胞培養のためのすべての公知培地を使用することができる。例えば前述のD M E M 培地、F 1 2 培地及びR P M I 1 6 4 0 培地が例示され、特にR P M I 1 6 4 0 培地が好適である。

本発明の培養用培地に含められるr HSAとは、遺伝子操作を経て調製されたHSA産生宿主により產生されるヒト血清アルブミンであれば特に限定されないが、好ましくは產生宿主に由来する夾雜成分（例えばタンパク質等）を実質的に含まない、より好ましくは公知の手段でr HSA產生宿主を培養した後、その培養濾液又は菌体、細胞からそれぞれ公知の分離手段及び精製手段により採取及び精製されたものが用いられる。

具体的には以下の方法が挙げられる。

本発明において用いられる、r HSAを得るための宿主は、遺伝子操作を経て調製されたものであれば特に限定されず、既に公知文献記載のものの他、今後開発されるものであっても適宜利用することができる。具体的には、遺伝子操作を経てr HSA產生性とされた菌（例えば、大腸菌、酵母、枯草菌等）、動物細胞等が例示される。特に、宿主として酵母、好ましくはサッカロマイセス属〔例え

ば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)]、もしくはピキア属 [例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)] を用いる。また、栄養要求性株や抗生物質感受性株を用いてもよい。さらに好適にはサッカロマイセス・セレビシエAH 22 株 (a, his 4, leu 2, can 1) 、ピキア・パストリス GTS 115 株 (his 4) が用いられる。

これらの r H S A 產生宿主の調製方法、該宿主を培養することによる r H S A の生産方法及び培養物からの r H S A の分離採取方法は、公知ならびにそれに準じた手法を採用することによって実施することができる。例えば、r H S A 產生宿主の調製方法としては、例えば通常の H S A 遺伝子を用いる方法 [特開昭 58-56684 号 (EP-A-73646 に対応) 、同 58-90515 号 (EP-A-79739 に対応) 、同 58-150517 号公報 (EP-A-91527 に対応)] 、新規な H S A 遺伝子を用いる方法 [特開昭 62-29985 号、特開平 1-98486 号公報 (共に EP-A-206733 に対応)] 、合成シグナル配列を用いる方法 [特開平 1-240191 号公報 (米国特許第 5409815 号、EP-A-329127 に対応)] 、血清アルブミンシグナル配列を用いる方法 [特開平 2-167095 号公報 (EP-A-319641 に対応)] 、組み換えプラスミドを染色体上に組み込む方法 [特開平 3-72889 号公報 (EP-A-399455 に対応)] 、宿主同士を融合させる方法 [特開平 3-53877 号公報 (EP-A-409156 に対応)] 、メタノール含有培地で変異を起こさせる方法、変異型 A O X₂ プロモーターを用いる方法 [特開平 6-90768 号、同 4-299984 号公報 (共に EP-A-506040 に対応)] 、枯草菌による H S A の発現 [特開昭 62-25133 号公報 (EP-A-229712 に対応)] 、酵母による H S A の発現 [特開昭 60-41487 号 (EP-A-123544 に対応) 、同 63-39576 号 (EP-A-248657 に対応) 、同 63-74493 号公報 (EP-A-251744 に対応)] 、ピキア酵母による H S A の発現 [特開平 2-104290 号公報 (EP-A-344459 に対応)] が例示される。

このうち、メタノール含有培地で変異を起こさせる方法は具体的には以下のように行う。すなわち、まず適当な宿主、好ましくはピキア酵母、具体的にはG T S 1 1 5 株 (N R R L 寄託番号 Y - 1 5 8 5 1) の A O X 1 遺伝子領域に常法により A O X 1 プロモーター支配下に H S A が発現する転写ユニットを有するプラスミドを導入して形質転換体を得る [特開平 2 - 1 0 4 2 9 0 号公報 (E P - A - 3 4 4 4 5 9 に 対応) を 参照] 。この形質転換体はメタノール培地中での増殖能は弱い。そこで、この形質転換体をメタノール含有培地中で培養して変異を起こさせ、生育可能な菌株のみを回収する。この際、メタノール濃度としては 0. 0 0 0 1 ~ 5 % 程度が例示される。培地は人工培地、天然培地のいずれでもよい。培養条件としては 1 5 ~ 4 0 °C 、 1 ~ 1 0 0 0 時間程度が例示される。

また、 r H S A 產生宿主の培養方法としては、上記の各公報に記載された方法の他に、フェッドバッチ培養 (半回分培養) により、高濃度のグルコースあるいはメタノール等を適度に少量ずつ供給し、產生菌体に対する高濃度基質阻害を避けて高濃度の菌体と産生物を得る方法 (特開平 3 - 8 3 5 9 5 号公報) 、培地中に脂肪酸を添加して r H S A の產生を増強する方法 [特開平 4 - 2 9 3 4 9 5 号公報 (米国特許第 5 3 3 4 5 1 2 号、 E P - A - 5 0 4 8 2 3 に 対応)] 等が例示される。

培養処理により產生された r H S A を、宿主細胞に由来する成分及び培養成分等から十分な精度をもって単離・精製する方法については各種の方法が提案されている。例えば、従来行われている方法として r H S A を含有する酵母培養液を、圧搾→限外濾過膜処理→加熱処理→限外濾過膜処理に供した後、陽イオン交換体のカラムクロマトグラフィー処理、疎水性クロマトグラフィー処理、陰イオン交換体のカラムクロマトグラフィー処理等の工程に供する方法 [特開平 5 - 3 1 7 0 7 9 号公報 (米国特許第 5 4 4 0 0 1 8 号、 E P - A - 5 7 0 9 1 6 に 対応) 、 Biotechnology of Blood Proteins. 1993, vol. 227, 293-298] が挙げられる。また、上記従来法の後で、さらにキレート樹脂処理またはホウ酸・塩処理の工程に供する方法も報告されている [特開平 6 - 5 6 8 8 3 号、 同 6 - 2 4 5 7 8 9

号公報（共に米国特許第 5 5 2 1 2 8 7 号、EP-A-6 1 2 7 6 1 に対応）]。

また、当該酵母培養液を加熱処理後に、吸着流動床技術を用いたストリームライン法〔特開平 8-1 1 6 9 8 5 号公報（EP-A-6 9 9 6 8 7 に対応）〕等を用いることもできる。このようにして調製・精製された r H S A は公知の手法、例えば、滅菌加熱、限外濾過膜処理、安定化剤の添加、除菌濾過、分注、凍結乾燥等により製剤化することができる。

本発明の培養用培地における r H S A の添加量としては 0. 1 ~ 5 g/L、好ましくは 0. 1 ~ 2 g/L 程度が例示される。

本発明の培養用培地には必要に応じてインスリン、ペプトン、トランスフェリン等を添加することができる。

インスリンは、その由来には特に制限はなく、好適にはウシ由来インスリン又は組み換えヒトインスリンが使用される。ペプトンは、その由来には特に制限はなく、好適には牛肉由来ペプトンが使用される。また植物由来ペプトンも同様に使用される。トランスフェリンは、その由来には特に制限はなく、好適にはヒト又はウシ由来のものが使用される。

本発明の培養用培地におけるインスリンの含有量は、0. 1 ~ 1 0 mg/L、好ましくは 0. 1 ~ 2 mg/L、ペプトンの含有量は 0. 1 ~ 5 0 g/L、好ましくは 1 ~ 1 0 g/L、トランスフェリンの含有量は 0. 5 ~ 2 0 mg/L、好ましくは 1 ~ 1. 5 mg/L である。

本発明の培養用培地には、さらに必要に応じてヒポキサンチン 0. 1 ~ 1 0 0 mg/L、好ましくは 1 ~ 2 0 mg/L、チミジン 0. 0 1 ~ 1 0 0 mg/L、好ましくは 1 ~ 1 0 mg/L、セレン 0. 0 1 ~ 1 0 0 μ g/L、好ましくは 1 ~ 1 0 μ g/L、 α -トコフェロール（ビタミン E）0. 0 0 1 ~ 1 0 mg/L、好ましくは 0. 0 1 ~ 0. 5 mg/L を加えることができる。

また、耐性遺伝子を有するベクターを含有する形質転換された動物細胞を培養しようとする場合には、プラスミド形質転換の安定性を保つために該培地に更にベクター中に含有された耐性遺伝子に相応する選択剤を加えることもある。選択

剤としては、当業者には周知のもの、例えばネオマイシン、ヒグロマイシン、マイコフェノール酸、ヒポキサンチン、キサンチン、アミノブチリンまたはメトトレキセイト（M T X）及びその誘導体が例示される。

本発明の培養用培地で培養可能な動物細胞としては、その細胞自体が生理活性物質產生可能なものでも、遺伝子工学により形質転換され異種の生理活性物質を產生するものであってもよい。細胞自体が生理活性物質を產生するものとして、例えば、モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ、インターフェロン（I FN）- α を產生する白血球、ナマルバ細胞、B A L L - 1 細胞、I FN- β を產生する纖維芽細胞、I FN- γ を產生するリンパ球、プロウロキナーゼあるいはウロキナーゼ（プロUKあるいはUK）を產生するヒト腎細胞、組織プラスミノーゲンアクチベータ（T P A）を產生するメラノーマ細胞（例えば、B o w e s 細胞）等が例示される。遺伝子工学により形質転換される株化された宿主細胞としては、V e r o 細胞、H e l a 細胞、C H O 細胞、W I 3 8 細胞、B H K 細胞、C O S - 7 細胞、M D C K 細胞、C 1 2 7 細胞、H K G 細胞、ヒト腎細胞株等が挙げられる。具体的には、C H O - K₁（チャイニーズハムスター卵巣細胞：A T C C C C L 6 1）、B H K（ハムスター腎細胞：A T C C C C L 1 0）、C O S - 7（C V - 1 O r i g i n, S V - 4 0 細胞：A T C C C R L 1 6 5 1）、V e r o 細胞（アフリカミドリザル腎細胞：A T C C C C L 8 1）等があり、更にはマウスミエローマ細胞（X 6 3 - A g 8 - 6 5 3；P 3 U 1）、ヒトリンパ芽球細胞（I M - 9, A T C C C C L 1 5 9）、ヒトヒトハイブリドーマ作製用親細胞、ならびにこれらのd h f r欠損株、H G P R T欠損株、ウアバイン耐性株等が例示される。

本発明の培養用培地を使用して動物細胞を培養する方法としては、通常、次の通りにして行われる。即ち、本発明の培養用培地を使用する動物細胞の培養には、培養用としてよく知られているディッシュ、フラスコ、ローラーボトル、スピナーフラスコ、マイクロキャリアー、マイクロカプセルあるいは中空糸を用いた培養装置等の培養容器が使用できるがこれらに限定されない。培養方法としては、

上記の培養容器等で通常行われる継代培養のほか、培養槽内から、連続的に、あるいは間歇的に古い培養液を細胞を含んだまま、あるいは細胞と分離して抜き出しつつ、それと見合う量の新しい培養液を供給して、長時間培養条件を一定に制御しつつ細胞を培養する連続的な培養法等が挙げられる。また、本発明の培養用培地を用いる動物細胞の培養はいわゆる高密度培養の形態で行うことができる。具体的には細胞数が 10^7 個/m²以上の高密度で行うのが好ましい。その他の培養条件として培養温度は30～37°C、培養時間は1～10日間が例示される。また、当該培地は適宜交換すれば、さらに長期間の連続培養が可能である。

細胞によるタンパク質等の生理活性物質の產生は、自体既知の手段にて行えよい。かかる手段としては、例えば特開昭61-177987号公報（EP-A-154272に対応）、特開昭63-146789号公報（米国特許第5098840号、EP-A-253241に対応）等に記載の方法等が挙げられる。

本発明の生理活性物質の製造方法によれば、例えばアンチトロンビン-III、プロUK、UK、TPA、B型肝炎ウィルス表面抗原、preS-B型肝炎ウィルス表面抗原、IFN、コロニー形成刺激因子、モノクローナル抗体等の生理活性物質を製造することができる。

実施例

以下に、本発明をより詳細に説明するために実施例を挙げるが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

実施例1 培養用培地の作製

基本培地としてRPMI 1640培地 (Goding, J. W (1980) J. Immunol. Methods 39, 285, JAMA 199 (1957)) 10.2gを用い、添加物としてrHSA 1g、インスリン1mg、牛肉由来ペプトン5g、トランスフェリン10mg、ヒポキサンチン13mg、チミジン4mg、 α -トコフェロール0.13mg及びセレン4 μ gを用いて培養用培地1Lを作製した。rHSAとしては特開平8-116985号に準じて調製したピキア・パストリス酵母由來のものを用いた。

実施例2 ヒト腎細胞株の培養

ヒト腎細胞株をマイクロキャリアビーズに付着させたものを実施例1で作製した培養用培地中に細胞数として、 10^7 個/ m^2 となるように添加した。37°C、5%CO₂の条件下で培養したところ、2日間で培養液中に0.6～2.5U/ m^2 相当のプロUKの産生が確認できた。その後、2～3日毎に培養液を交換し、長期間（すくなくとも1ヶ月以上）の連続培養が可能であった。

発明の効果

本発明の培養用培地に、品質の一定な遺伝子操作により得られたヒト血清アルブミン(rHSA)を使用することにより、血清含有培地及び/または血漿由来HSAを含有してなる従来の無血清培地を使用した場合と同等の細胞増殖性及び生理活性物質産生性等の効果を維持し、且つ培地の品質の安定化、培養の再現性の確保が可能となった。

本出願は日本で出願された平成8年特許願第210004号を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. 遺伝子操作により得られたヒト血清アルブミンを含有してなる培養用培地。
2. 基本培地としてD M E M 培地、F 1 2 培地またはR P M I 1 6 4 0 培地を含有する請求の範囲第1項記載の培養用培地。
3. 遺伝子操作により得られたヒト血清アルブミンが、ヒト血清アルブミン產生性の酵母により產生されたものである請求の範囲第1項記載の培養用培地。
4. さらにインスリンを含有する請求の範囲第1項記載の培養用培地。
5. さらにペプトンを含有する請求の範囲第1項記載の培養用培地。
6. さらにトランスフェリンを含有する請求の範囲第1項記載の培養用培地。
7. さらにインスリン、ペプトンおよびトランスフェリンを含有する請求の範囲第1項記載の培養用培地。
8. 動物細胞を請求の範囲第1項記載の培地にて培養することを特徴とする動物細胞の培養方法。
9. 動物細胞はそれ自体が生理活性物質を產生可能なもの、または遺伝子工学により形質転換されて異種の生理活性物質を產生するものである請求の範囲第8項記載の培養方法。
10. 動物細胞がヒト腎細胞株、ハイブリドーマ、白血球、ナマルバ細胞、B A L L - 1 細胞、纖維芽細胞、リンパ球、ヒト腎細胞、メラノーマ細胞、V e r o細胞、H e l a 細胞、C H O 細胞、W I 3 8 細胞、B H K 細胞、C O S - 7 細胞、M D C K 細胞、C 1 2 7 細胞、H K G 細胞、マウスミエローマ細胞、ヒトリシバ芽球細胞またはヒトヒトハイブリドーマ作製用親細胞、あるいはこれらのd h f r 欠損株、H G P R T 欠損株、ウアバイン耐性株である請求の範囲第8項記載の培養方法。
11. 生理活性物質を產生可能な動物細胞を請求の範囲第1項記載の培地で培養して当該生理活性物質を產生させ、培養物から該生理活性物質を採取することを特徴とする生理活性物質の製造方法。
12. 動物細胞はそれ自体が生理活性物質を產生可能なもの、または遺伝子工

学により形質転換されて異種の生理活性物質を產生するものである請求の範囲第
11項記載の製造方法。

13. 生理活性物質がプロウロキナーゼ、ウロキナーゼ、アンチトロンビン
III、組織プラスミノーゲンアクチベータ、B型肝炎ウィルス表面抗原、プレS
-B型肝炎ウィルス表面抗原、インターフェロン、コロニー形成刺激因子または
モノクローナル抗体である請求の範囲第11項記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl⁶ C12N5/02, C12N5/06, C12N5/08, C12N5/10, C12N5/20, C12N5/24, C12P21/00, C12P21/02, C12P21/08 // C12N15/00, (C12N21/00, C12R1:91), (C12N21/02, C12R1:91), According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N5/00-5/24, C12P21/00-08, C12N15/00-90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Cytotechnology, Vol. 19, No. 1, (1995-1996), Castro P.M.L. et al.,; "CHO cell growth and recombinant interferon-gamma production: Effects of BSA, Pluronic and lipids.", see p. 27-36	1 - 13
Y	Thrombosis Research, Vol. 31, No. 4, (1983), Willens C. et al.,; "The Proliferation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Serum-Free Medium.", see p. 623-634	1 - 10
Y	JP, 63-074493, A (Delta Biotechnology Ltd.), April 4, 1988 (04. 04. 88) & EP, 248637, A & AU, 8773786, A & ZA, 8703973, A & FI, 8702470, A & DK, 8702807, A & GB, 2191492, B	1 - 13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
November 4, 1997 (04. 11. 97)

Date of mailing of the international search report
Decmeber 24, 1997 (24. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02749

A. (Continuation) CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(C12N21/08, C12R1:91)

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N5/02, C12N5/06, C12N5/08, C12N5/10, C12N5/20, C12N5/24, C12P21/00, C12P21/02, C12P21/08 // C12N15/00, (C12N21/00, C12R1:91), (C12N21/02, C12R1:91), (C12N21/08, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N5/00~5/24, C12P21/00~08, C12N15/00~90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Cytotechnology. Vol. 19, No. 1. (1995-1996), Castro P.M.L. et al.,; "CHO cell growth and recombinant interferon-gamma production : Effects of BSA, Pluronic and lipids.", see p. 27-36	1-13
Y	Thrombosis Research. Vol. 31, No. 4. (1983), Willems C. et al.,; "The Proliferation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Serum-Free Medium.", see p. 623-634	1-10
Y	JP, 63-074493, A(「カババイオテクノロジー リミテッド」), 4.4月, 1988 (04.04.88), & EP, 248637, A & AU, 8773786, A & ZA, 8703973, A & FI, 8702470, A & DK, 8702807, A & GB, 2191492, B	1-13

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.11.97

国際調査報告の発送日

24.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

齊藤 真由美

4B 8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448